

## 通用外泌体分离试剂盒（SEC法）

货号：P-CA-502

规格：4Tests

### 一、产品描述

本试剂盒基于分子排阻色谱原理，根据被分离组分分子大小差异进行外泌体的分离。具有操作简便、高纯度和高回收率等优点，特别适用于大体积样本中的外泌体分离。分离的外泌体可用于 WB 分析、NTA 或纳米流式粒径分析、电镜检测、组学研究、细胞和动物功能研究等。

### 二、产品组成

组分名称	4Tests	保存条件
Exosome Purification Column (10 mL)	4Tests	2-8°C，避光保存
Column Adapter (10 mL)	4Tests	2-30°C，避光保存

### 三、保存条件

试剂盒冰袋运输，外泌体纯化柱 2-8°C 避光保存；保质期 18 个月。

### 四、适用样本

最常用于细胞培养上清、尿液等大体积样本，也适用于血清、血浆等样本。其他微量珍贵样本，请向本公司技术人员咨询。

### 五、自备仪器、试剂和耗材

- 高速冷冻离心机
- 离心管
- 废液槽/缸
- 超滤管（MWCO: 50 kDa）
- 无菌 PBS（现配现用，0.2 μm 过滤，超声或真空脱气）
- 20%乙醇（现配现用，0.2 μm 过滤，超声或真空脱气）
- 纯化柱固定器（Purification Column Stand）

### 六、使用方法

#### 1. 样品预处理

1) 去除细胞。4°C，300 g，离心 5 min，转移上清到新的离心管；

**注意：**对无细胞的样品，可以跳过此步骤。

2) 去除细胞及细胞碎片。4°C，2000 g，离心 10 min，转移上清到新的离心管；

3) 去除大体积颗粒。步骤 2) 得到的上清，4°C，14000 g，离心 30 min，转移上清到新的离心管。

#### 2. 纯化柱预处理



1) 提前将纯化柱 (Exosome Purification Column (10 mL)) 安装在纯化柱固定器 (Purification Column Stand) 上, 纯化柱下面放置废液槽。放置于室温 30 min 以上, 恢复室温;

**注意: 纯化柱需充分平衡至室温 (18-25°C), 温度过低或过高, 都会影响外泌体分离效果。**

2) 检查纯化柱下端是否充满液体。如果纯化柱下端无空气, 可以跳过该步骤; 若纯化柱下端存在空气, 将纯化柱倒置, 打开下端密封帽, 用移液器或注射器取水或 20%乙醇顶出空气, 在密封帽中充满水或 20%乙醇, 再盖上密封帽, 放回固定器上;

3) 先打开纯化柱顶盖, 再打开下端的密封帽, 弃去纯化柱上的封柱液 (可直接倒掉或者用移液器吸取), 向纯化柱中加入 3 mL PBS 备用。将适配器 (Column Adapter (10 mL)) 与纯化柱连接, 并从顶部加入 2 倍柱体积 (20 mL) PBS 平衡纯化柱, 至下方没有溶液流出。清洗过程中, 纯化柱的顶部筛板必须始终保持湿润。冲洗完成后, 盖上底端密封帽, 断开适配器, 加入 1 mL PBS 备用。

a. **注意要先打开纯化柱上盖, 再打开下端的密封帽, 否则空气将进入纯化柱中, 影响外泌体分离效果。**

b. **在整个外泌体分离纯化过程中, 纯化柱的顶部筛板必须始终保持湿润, 否则影响外泌体分离效果。**

c. **需要向纯化柱中加入大体积溶液时, 可以将适配器与纯化柱连接, 将溶液加入到适配器中。**

d. **PBS 推荐新鲜配制并经 0.2 μm 滤膜过滤, 或采购商业化无菌的 PBS, 避免微生物或颗粒物污染。PBS 溶液使用前, 必须平衡到室温, 否则纯化柱中可能出现大量气泡, 影响外泌体分离效果。**

### 3. 分离外泌体

1) 样品上样。移除纯化柱中的 PBS, 在上方加入 1 mL 样本; 样本不足 1 mL, 可用 PBS 补至 1 mL, 混匀后上样。取下纯化柱底部密封帽, 等待样本全部进入纯化柱内后, 再加 PBS;

a. **如果样品体积超过 1 mL, 建议使用 50 kDa 超滤管浓缩样品至 1 mL, 注意浓缩体积不超过 20 倍。超滤浓缩方法详见超滤管的说明书。**

b. **对于高粘度样本, 如血浆、血清、高粘度胸腹水等样本, 可取 0.5 mL 样本, 用 PBS 稀释至 1 mL, 混匀后上样。**

c. **必须待样品全部进入筛板后, 再加入 PBS, 避免样品被稀释影响分离效果。**

2) 外泌体分离。先在纯化柱下方准备好 1.5 mL 离心管, 然后在纯化柱上方加入 0.5 mL PBS。待下方收集到 0.5 mL 馏分后, 可加下一次 0.5 mL PBS, 换新的 1.5 mL 离心管收集。根据流出顺序分别标记馏分管编号。

3) 外泌体收集。收集 4、5、6、7、8 号馏分管即可获取外泌体, 其中 5、6、7 号馏分管的外泌体浓度更高。收集液可直接测定外泌体颗粒数和蛋白浓度。

4) 外泌体浓缩。测定收集外泌体的颗粒浓度和蛋白浓度, 根据后续实验要求, 决定是否对外泌体收集液进行浓缩。如浓缩, 建议使用 MWCO 50 kDa 的超滤管, 4000 g 离心浓缩到目的体积即可。

### 4. 纯化柱维护



- 1) 收集完所有馏分后，将适配器与纯化柱连接，并从顶部加入至少 2 倍柱体积（20 mL）PBS 清洗纯化柱，至下方没有溶液流出。
- 2) 再加 1.5 倍柱体积（15 mL）的 20%乙醇清洗纯化柱，至下方没有溶液流出。
- 3) 最后取下适配器，向纯化柱中加入 3 mL 20%乙醇的封闭液，安装纯化柱顶盖，然后在密封帽中充满 20%乙醇，盖到纯化柱下端出口，置于 4°C 直立保存。

## 七、产品优势

1. 样本体积兼容范围广 0.1-1 mL 样本体积都兼容；
2. 纯化外泌体纯度高 可直接用于鉴定检测或外泌体示踪和功能研究等；
3. 操作简单 重力柱模式无需专业的纯化设备，对场地设备要求少，时间短；
4. 回收率高 可自由选馏分管蛋白污染程度低，分离出的组分无蛋白污染。

## 八、注意事项

1. 新购买或使用后的纯化柱，上筛板和白色琼脂糖微球之间可能会出现一定的空隙，这是储存和使用过程中凝胶沉降造成的，并不影响纯化柱的性能，将上筛板向下推至无空隙即可正常使用；
2. 纯化柱保存在封闭液中，封闭液为20%乙醇。20%乙醇建议现配现用，同时经0.2 μm滤膜过滤、超声或真空脱气，避免造成纯化柱出现大量气泡，影响分离效果；
3. 每次纯化柱使用前需要使用无菌并平衡至室温的PBS清洗。PBS建议现配现用，同时经0.2 μm滤膜过滤、超声或真空脱气，避免造成纯化柱出现大量气泡，影响分离效果；
4. 纯化柱中间不能有气泡，使用前需认真检查，避免影响实验；
5. 纯化柱可以反复利用，但是多次使用会影响效果，建议重复使用不超过5次；
6. 当分离的外泌体进行NGS或者其他组学分析时，为避免交叉污染，建议每个样品使用一支新的纯化柱。

